

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 7 月 8 日 (08.07.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/056895 A1(51) 国際特許分類: C08F 290/02, 2/44, G01N
33/545, A61K 47/30, H01F 1/28, 1/36千葉県 野田市 山崎 2 7 0 4 - 1 1 8 Chiba (JP), 石垣 弘
一郎 (ISHIGAKI, Kouichiro) [JP/JP]; 〒901-0231 沖縄
県 豊見城市 我那覇 1 8 7 - 5 Okinawa (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/016326

(22) 国際出願日: 2003 年 12 月 19 日 (19.12.2003)

(74) 代理人: 小田島 平吉, 外(ODAJIMA, Heikichi et al.);
〒107-0052 東京都 港区 赤坂 1 丁目 9 番 1 5 号 日本
自転車会館 小田島特許事務所 Tokyo (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2002-367683
2002 年 12 月 19 日 (19.12.2002) JP(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人
東京理科大学 (TOKYO UNIVERSITY OF SCIENCE,
EDUCATIONAL FOUNDATION) [JP/JP]; 〒162-8601
東京都 新宿区 神楽坂 1 丁目 3 番地 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 長崎 幸夫
(NAGASAKI, Yukio) [JP/JP]; 〒302-0128 茨城県 守
谷市 けやき台 3-5-17 Ibaraki (JP). 片岡 一則
(KATAOKA, Kazunori) [JP/JP]; 〒165-0031 東京都
中野区 上鷺宮 5-17-22 Tokyo (JP). 高橋 唯仁
(TAKAHASHI, Tadahito) [JP/JP]; 〒231-0852 神奈川県
横浜市 中区 西竹之丸 8 5-1-21 4 Kanagawa (JP).
大塚 英典 (OTSUKA, Hidenori) [JP/JP]; 〒305-0044 茨
城県 つくば市 並木 2-11 214-705 Ibaraki
(JP). 伊藤 徳之 (ITO, Noriyuki) [JP/JP]; 〒278-0022 千(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS,
MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特
許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッ
パ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: LATEX PARTICLES AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME

(54) 発明の名称: ラテックス粒子およびその製造方法

(57) Abstract: It is intended to provide latex particles with reduced non-specific adsorption or binding of undesired contaminants occurring in using latex particles, a process for producing these particles and a diagnostic agent containing the particles. Namely, latex particles having a ligand-group holding site which is a ligand-group holding site having a ligand group at one end, binding to a latex particle at the other end and having a long polyoxyethylene chain; and a non-specific adsorption inhibiting site which binds to a latex particle at one end and has a short polyoxyethylene chain, and a process for producing these particles.

(57) 要約: ラテックス粒子を用いた場合に生じる不所望な夾雑物の非特異的な吸着又は結合を抑制した、ラテックス粒子、該粒子の製造方法、及び該粒子を含有する診断剤の提供。一端にリガンド基を有し他端がラテックス粒子に結合するリガンド基保持部位であって長鎖のポリオキシエチレン鎖を有するリガンド基保持部位;一端がラテックス粒子に結合し短鎖のポリオキシエチレン鎖を有する非特異的な吸着抑制部位;を有するラテックス粒子、該粒子の製造方法が提供される。

WO 2004/056895 A1

明 細 書

ラテックス粒子およびその製造方法

技術分野

- 5 本発明は、主として、生体成分の検出、診断の技術分野で用いることのできる磁性粒子または標識含有ラテックスポリマー粒子およびそれらの粒子の製造方法に関する。

背景技術

- 従来、生体成分の検出、診断等に用いられてきた無機金属含有ラテックスポリマー粒子として、疎水性のビニル芳香族モノマー（また、場合によりコモノマーを含んでもよい）および磁性粒子を分散させた有機層と乳化剤を含む水性溶液との乳化重合により製造されるものが挙げられる。そして、該ラテックス粒子中へ磁性粒子を効率よく封入するのに、水不溶性の有機化合物を共存させて乳化重合を行っている（例えば、特許文献 1 参照。）。
- 10 15

- また、特許文献 1 に記載された方法において合成される「磁性粒子は、磁性体がポリマーによりコーティングされている形状で、核となる磁性体の粒子径の違いにより、大きさの異なる磁性粒子となる。このため、磁性粒子の大きさを均一に制御する方法は難しく、磁性体の粒子径が 0.1 ～ 1.0 μm の範囲内での大きさの制御は特に困難である。また、合成操作が非常に繁雑である。」として、ポリスチレンまたはスチレンーブタジエン共重合体であるラテックスポリマー粒子を予め有機溶媒および加熱を用いて膨潤させておき、磁性体または蛍光性物質を初めとする標識性物質を加えて混合攪拌することにより、ラテックスポリマー粒子の表
- 20

層近傍に蛍光性物質等を包埋させる方法が提供されている（例えば、特許文献 2）。

特許文献 1 に記載された乳化重合の際に、磁性体粒子をラテックスポリマー粒子中に封入する方法に随伴する短所が存在するためか、ラテックスポリマー粒子への磁性体または蛍光体の封入または包埋は、殆どが膨潤させたポリマー粒子を蛍光体等（必要により、キレート化合物とする。）の水性溶液と接触させて蛍光体等をポリマー粒子またはマイクロスフェア内へ混入または取り込ませる方法が採用されている（例えば、特許文献 3、特許文献 4 参照。）。なお、特許文献 3 には、ラテックスポリマー粒子の水溶液中での安定性を高め、生理学的に反応性の種を共有結合または吸収によって該ポリマー粒子に固定するために、スチレン等の疎水性モノマーと、その他に、アクリルアミド等の非イオン性水溶性モノマーおよびアクリル酸等の陰イオン性モノマーを用いて得られたラテックスポリマー粒子が記載されている。また、特許文献 4 では、水媒体中での安定性に優れるだけでなく、タンパク質等の機能性物質を化学結合により安定に固定することが可能で、かつタンパク質等の非特異的吸着が起こりにくい反応性マイクロスフェアを提供する目的で、片末端に重合可能なエチレン性基を有し、もう一つの片末端に活性エステル基を有するポリ（オキシアルキレン）セグメントからなるマクロマーがスチレンモノマー等のコモノマーとして用いられている。

なお、上記および下記において引用する文献は、次のとおりである。

【特許文献 1】

特開昭 56-164503 号公報（特に、第 1 頁右下欄 2-14 行参照。）

【特許文献 2】

特開平 10-55911 号公報（特に、第 2 頁右欄 33-44 行、第 5 頁左欄 34-45 行参照。）

【特許文献 3】

- 5 特開昭 61-218945 号公報（特に、第 4 頁左下欄 4-16 行、第 3 頁右上欄 2-15 行参照。）

【特許文献 4】

特開平 8-133990 号公報（特に、第 2 頁左欄 [請求項 1]、同右欄 18-28 行参照。）

10 発明の開示

- 特許文献 3 に記載のラテックスポリマー粒子は水溶液中での分散安定性が高まっているものの、生物学的流体（例えば、血清、尿、等）を含む試料中で使用すると、タンパク質等の非特異的吸着が生じる傾向がある。他方、特許文献 4 に記載のマイクロスフェアはある程度は上述の
- 15 タンパク質等の非特異的吸着を抑制することに成功しているが、未だ満足できるものでなく、また、かようなマイクロスフェアを製造する際に、磁性粒子または標識の混入を企てる（当該文献中では、かような混入について記載も示唆もしていない。）と、マイクロスフェア間での凝集が生じて分散安定性を欠くものが得られる傾向がある。

- 20 本発明者らは、特定のマクロマーと 1 種もしくは 2 種以上のラテックス形成に関与するモノマーを水性媒体中でレドックス重合させると、上述の凝集を殆どまたは全く起こすことなく、極めて粒度分配範囲の狭いラテックス粒子が得られることを見出した。また、こうして得られるラテックス粒子はタンパク質等の非特異的吸着も低減できることを見出し

た。かようなタンパク質等の非特異的吸着は、鎖長が明確に異なる 2 種のマクロマーを使用すると、さらに低減することも見出した。

また、特定のマクロマーを用いる重合に際し、ラテックス形成に関与するモノマーの一部を、予めラテックス粒子にしておき、次いで該マクロマーおよび残りのモノマーを重合（所謂、シード重合）せしめると、
5 ソープレスで所望のラテックス粒子を形成することができることも見出した。

したがって、本発明によれば、

(i) 片末端に重合可能なエチレン性基を有し、疎水性ポリマーセグメントを介するかもしくは介することなく、他の片末端側に親水性ポリマーセグメント（ここで、このセグメントはリガンド導入用基で末端
10 化 (terminated) されていてもよい。）を有するマクロマー、

(ii) 1 種もしくは 2 種以上のラテックス形成に関与するモノマー、

(iii) 重合開始剤、好ましくはレドックス開始剤、および

15 (iv) 場合によって、存在してもよい磁性体または標識

を含んでなる水性媒体中で、該水性媒体を攪拌しながら重合反応を行うことを特徴とするラテックスポリマー粒子の製造方法が提供される。

特定の態様の本発明では、予め (ii) に記載のモノマーを用いて形成したラテックス粒子の共存下で重合反応（所謂シード重合）が行われる
20 ことを特徴とする前記製造方法が提供される。

また、本発明によれば、該製造方法で都合よく製造することができる、ポリマーラテックス粒子であって、使用される総モノマー重量当たり、

a) 片末端に重合可能なエチレン性基を有し、疎水性ポリマーセグメントを介するかもしくは介することなく、他の片末端側に親水性ポリ

マーセグメント（ここで、このセグメントはリガンド導入用基で末端化（terminated）されていてもよい。）を有するマクロマー 0.5 ～ 99.5 重量%、および

- b) 1 種もしくは 2 種以上のラテックス形成に関与するモノマー 0.5 ～ 99.5 重量%の重合によって得られる高分子材料であって、動的光散乱（DLS）光度計で測定した場合に平均粒径 $0.01 \mu\text{m} \sim 5 \mu\text{m}$ を有し、粒子の表層（シェル）領域に親水性ポリマーセグメントが存在し、好ましくは磁性体または標識が粒子の核（コア）領域に混入している、ことを特徴とするポリマーラテックス粒子も提供できる。

10

図面の簡単な説明

- 図 1 は、FITC-BSA 吸着量の洗浄回数による変化を各々の粒子 A-1、A-3、B-1 及び B-2 についてグラフ化した図である。図中の記号、◇はビオチン化磁性ラテックス粒子 A-3、■は磁性ラテックス粒子 A-1、△はビオチン化フェライトビーズ B-2、そして×はフェライトビーズ B-1 を表す。

15

図 2 は、ストレプトアビジン吸着量の洗浄回数による変化を各々の粒子 A-1、A-3、B-1 及び B-2 についてグラフ化した図である。図中の記号は図 1 と同じ意味を有する。

- 図 3 は、本発明で得られるラテックス粒子分散液を示す図に代わる写真である。ここで、(a) がレドックス開始剤を用いて得られるラテックスの状態を示す写真であり、(b) がラジカル開始剤を用いて得られるラテックスの状態を示す写真である。

20

図 4 は、実施例 5 で得られた磁性ラテックスの状態を表す図に代わる

顕微鏡写真である ((b) 参照。なお、(a) は通常のラテックス粒子の状態を表す。)

発明の具体的な態様および発明を実施するための最良の形態

本発明に関連して、「ラテックスポリマー粒子」とは水性媒体中でラテックスを形成しうるポリマー粒子または高分子材料を意味し、そしてラテックスは、ゴム系ラテックスおよび樹脂ラテックス等を包含する広義な概念として用いており、水を主たる分散媒としたポリマー粒子の分散液である。水性媒体は、水と混和しうる有機溶媒、例えば、エタノール、メタノール、テトラヒドロフラン、アセトン、アセトニトリル等、さらには緩衝剤等を含み得る水溶液を意味し、特定例では純水である。

粒子の表層 (シエル) 領域とは、本発明によれば、限定されるものではないが、重合可能なエチレン性基に由来する重合鎖とエチレン性基に結合した疎水性基 (例えば、芳香族基、アルキル基、等) からなる粒子の核 (コア) 部を取り巻く領域をいい、通常、親水性ポリマーセグメントで覆われる。磁性体または標識が混入されている粒子では、磁性体等は前記のコア領域または部分に完全に封入されているか、あるいは部分的に包埋されているものと、理解されている。

「リガンド導入用基で末端化 (terminated) される」とは、重合可能なエチレン性基側と逆の親水性ポリマーセグメントの末端にリガンド導入用基が末端基として存在することを意味する。リガンド導入用基は、後述する一般式 I - a の X のごとく、リガンド分子と共有結合しうる官能基 (容易に離脱しうる限り保護されていてもよい) を意味する。リガンドは、一般には、機能タンパク質に特異的に結合する物質 (例えば、抗体に結合する抗原またはハプテン、酵素に結合する基質、受容体に結

合するホルモン、レクチン、ビオチン等)をいうが、これらの逆、例えば抗原と結合する抗体またはその断片 (F_{ab} , $F(a_b')$ ₂、等)も包含する概念として用いている。

本明細書で、例えば、「炭素原子数 1 ~ 3」と「 $C_1 - C_3$ 」等の表示
5 は互換可能に用いている。マクロマーは、マクロモノマーとも称され、通常、分子量が数千~数万の重合可能なポリマーを意味するが、本発明に関しては、適する場合には、分子量数百のもしくはそれ以下のオリゴマーに分類されるものも包含する。本発明で用いるマクロマーは、片末端に重合可能なエチレン性基を有し、疎水性ポリマーセグメントを介する
10 るかもしくは介することなく、他の片末端側に親水性ポリマーセグメント(ここで、このセグメントはリガンド導入用基で末端化(terminated)されていてもよい。)を有する。ここで、「重合可能なエチレン性基」とは、ラジカル重合開始剤およびレドックス開始剤で重合しうる基をいう。このような残基の例としては、(メタ)アクリロイル、芳香族環が置換された
15 るかしくは未置換のビニルベンジル、ビニルフェニル、等が挙げられる。

「疎水性ポリマーセグメントを介するかもしくは介することなく」とは、マクロマーは、場合によって疎水性ポリマーセグメントを有し、所謂、ブロックコポリマーであることができることを意味する。このよう
20 なセグメントは、該セグメントに相当する独立したポリマーが水に難溶性ないし不溶性であるものポリマー鎖に由来するセグメントと、理解されている。限定されるものでないが、このような疎水性セグメントは、ポリ(ラクチド)鎖、ポリ(ϵ -カプロラクトン)鎖、ポリ(α -および/もしくは β -ベンジルアスパラギン酸)鎖、ポリ(γ -ベンジルグ

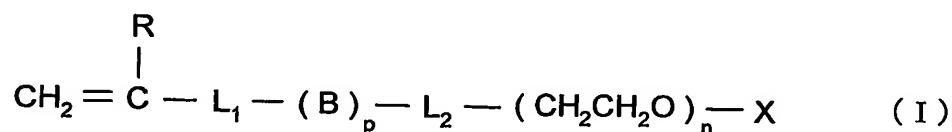
ルタミン酸) 鎖であることができる。

他方、マクロマーの必須のセグメントである親水性ポリマーセグメントは、相当する独立したポリマーが水に可溶性となるポリマー鎖に由来するセグメントである。このような親水性セグメントは、非イオン性であることが好ましく、限定されるものでないが、ポリ(エチレングリコール) [以下、PEGと略記する場合があります、なお、ポリ(オキシエチレン) もしくはポリ(エチレンオキシド) と互換可能な用語である。]、ポリ(ビニルアルコール)、ポリ(ビニルピロリドン)、ポリ(デキストラン)、ポリ(デキストリン)、ゼラチン、等の主鎖に由来する。

これらの親水性セグメントの中では、特に、PEGが好ましい。

マクロマーは、上述のようにリガンド導入用基を有しており、かかる基またはその部分としては、ヒドロキシル基、カルボキシル基、スルホ基、アルデヒド基、アミノ基、イミノ基、メルカプト基、活性エステル型の保護されたヒドロキシル基、活性エステル型の保護されたカルボキシル基、アセタール型の保護されたアルデヒド基、有機スルホンイルで保護されたヒドロキシル基、反応性の保護されたアミノ基およびC₁~C₄アルコキシル基(例えば、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、i s o -プロポキシ等) からなる群より選ばれる基、を挙げることができる。

したがって、このようなマクロマーは、下記一般式(I) で表すことができる。

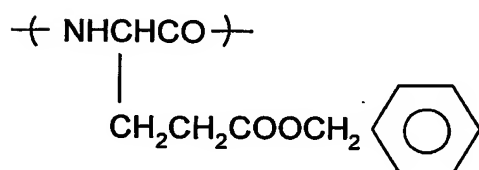
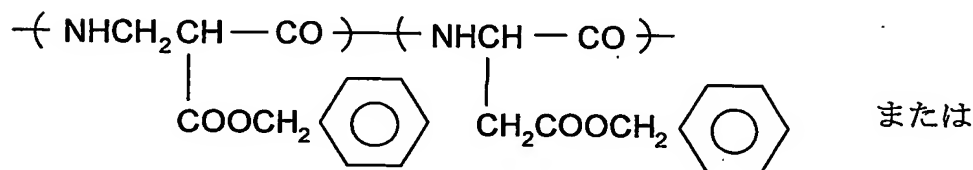
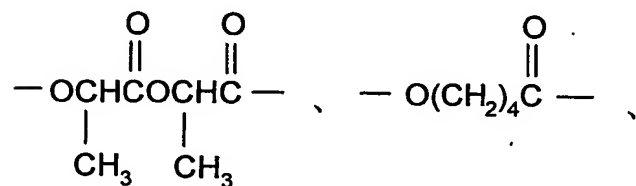


式中、Rは水素原子または炭素原子数1~3(またはC₁~C₃とも表

示でき、例えば、メチル、エチル、プロピル、等)を表し、

- L_1 は、 $(CH_2)_aO$ 、 COO 、 OCO 、 $CONH$ 、 $(CH_2)_aNH$ 、フェニレン(C_6H_4)、フェニレンオキシ(C_6H_4O)、オキシフェニレン(OC_6H_4)、ベンジルオキシ($C_6H_4CH_2O$)またはオキシベンジル($OC_6H_4CH_2C_6H_4$)を表し(ここで、 a は 1 ~ 3 の整数であり、各基は記載された方向で上記一般式中に組み込まれる。)を表し、

B は、式



を表し、

- 10 L_2 は、酸素原子、 $C_1 - C_4$ アルキレン、カルボニル、イミノ、およびこれらの 2 個以上が組合わさった連結基を表し、

X は、 $(CH_2)_b$ もしくは $CO(CH_2)_b$ を介するかまたは介することなく結合したヒドロキシル基、カルボキシル基、スルホ基、アルデヒド基、アミノ基、イミノ基、活性エステル型の保護されたヒドロキシル基、

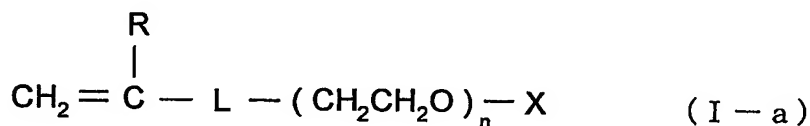
保護されたアミノ基 $\left(-\text{N} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} \right)$ 、 活性エステル型の保護された

カルボキシル基およびアセタール型の保護されたアルデヒド基（アセタール化ホルミル等）からなる群より選ばれる基を表し、

n は 11 ～ 10,000 の整数を表し、そして

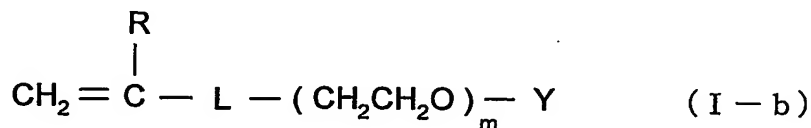
5 p は 0 ～ 500 の整数（存在する場合は 5 ～ 500 の整数）を表す。

本発明に従えば、マクロマーは、2種類同時に使用するのがタンパク質等の非特異的吸着を防止する上で好ましい。このようなマクロマーの第一のものとしては、下記一般式（I-a）で表されるものが挙げられる。



10 式中、R、Xおよびnは、上記の一般式（I）について定義したのと同義であり、Lは、上記の一般式（I）のL₁について定義したのと同義である。

第二のマクロマーとしては、下記一般式（I-b）で表されるものが挙げられる。



15

式中、R、Lは、上記の一般式（I-a）について定義したのと同義であり、Yは水素原子、ハロゲン原子（フッ素、塩素、臭素）で置換されていてもよい炭素原子数1～6のアルキル基またはハロゲンもしくは

炭素原子数 1 ～ 3 のアルキル基もしくはアルコキシル基でベンゼン環が置換されていてもよいベンゼン基を表し、 m は n 数より 10 以上小さい整数を表し、 n に依存するが、好ましくは 20 ～ 1,000、より好ましくは 30 ～ 200 の整数である。

- 5 以上に記載のマクロマーは、親水性ポリマーセグメントがポリ（エチレングリコール）鎖を有するものについては、米国特許第 5,925,720 号または WO 96/33233 に記載の方法に従って、またはそれらの方法を適宜改良して得ることができる。その他のマクロマーは、親水性ポリマーセグメントおよび存在する場合には、疎水性ポリマーセグメント
- 10 に対応するポリマーをそれぞれ当業者に周知の方法にり連結させ、そして、両末端を適宜、所望の基により修飾すればよい。

特に、上記の一般式（I - a）で表されるマクロマーと一般式（II - b）で表されマクロマーを同時に使用して得られるポリマーラテックス粒子は、その表面へのタンパク質等の非特異的吸着が著しく抑制できる

15 のが好ましい。一般式（I - a）のマクロマー対一般式（I - b）のマクロマーの使用割合は、1 : 5000 ～ 5000 : 1、好ましくは 1 : 3000 ～ 3000 : 1、特に好ましくは 1 : 100 ～ 1000 : 1 にある。

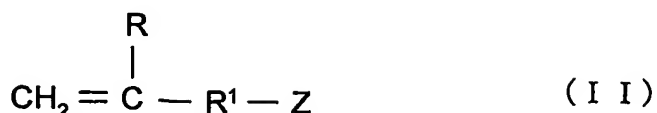
ラテックス形成に関与するモノマーは、少なくとも上記のモノマーと

20 一緒に重合した場合にポリマーラテックス粒子を形成できるモノマーであれば、その種類を問うことなく、本発明で利用できる。このようなモノマーの例としては、限定されるものでないが、疎水性ビニルモノマー、特にビニル芳香族化合物、例えば置換又は無置換のスチレン、1 - ビニルナフタリン、より具体的にはスチレン、 t - メチルスチレン、エチル

スチレン、*p*-プロモスチレン、ビニルトルエン、*t*-ブチルスチレンなどを挙げることができる。その他にも、(メタ)アクリル酸 C_1-C_4 アルキル、例えばアクリル酸メチル、メタクリル酸メチル、アクリル酸エチル、メタクリル酸エチル、アクリル酸*n*-ブチル、メタクリル酸*n*-ブチル；置換（例えば、 C_1-C_6 アルキルもしくはハロゲン原子置換）又は無置換の共役ジエン、例えばブタジエン、イソプレンなどを挙げることができる。このうち、スチレンは、コストの面、及びその特性としての硬さの点で好ましい。

これらのラテックス形成に関与するモノマーの一部は、少なくともマクロマーと共重合させる場合に予めラテックス粒子を形成しておいて共存させてもよい。通常、このような重合様式それ自体は、シード重合として当該技術分野では知られており、より大きい粒子を形成させるのに適している。本発明のラテックス粒子をこのようなシード重合により製造しても、上記のようなマクロマーの存在により、所謂、ソープレスでラテックス粒子が均一に分散し、しかも安定なラテックスを得ることができる。こうして得られるラテックス粒子はラテックス形成に関与するモノマーから本質的になる（つまり、95%以上、好ましくは98%以上を該モノマーが占める。）ラテックス粒子に磁性体が付着もしくは混入し、残りの該モノマーはラテックス粒子内または表面で重合し、かつマクロマーも、場合によって、それらの一部がラテックス粒子内で重合し、そしてマクロマーの親水性セグメントが該表面に存在するものと、理解される。

本発明に従いポリマーラテックス粒子を製造するには、さらなるモノマーとして、一般式（II）



(上式中、Rは水素原子または炭素原子数1～3のアルキル基を表し、

5 R^1 は単結合、 $(\text{CH}_2)_a$ 、 $\text{CH}=\text{CH}$ 、 COO 、 OCO 、 CONH 、 $(\text{CH}_2)_a\text{NH}$ 、フェニレン(C_6H_4)、フェニレンオキシド($\text{C}_6\text{H}_4\text{O}$)、オキシフェニレン(OC_6H_4)、ベンジルオキシ($\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{O}$)またはオキシベンジル($\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_4$)を表し(ここで、 a は1～3の整数であり、各基は記載された方向で該式中に組み込まれる。)、

10 Zは水素原子、アミノ基、モノもしくはジ- C_1 - C_3 アルキルアミノ基、カルボキシル基、シアノ基、アミド基、ウレタン基およびウレア基からなる群より選ばれる基を表す。)

で表されるモノマー含めることができる。したがって、本発明により提供できるポリマーラテックス粒子は、上記のマクロマー、ラテックス形式に
15 関与するモノマーおよび一般式(II)で表されるモノマーに由来する重合鎖を含み得る。これらのモノマーの具体的なものとしては、例えば、メタクリル酸ジエチルアミノエチル、p-ビニル安息香酸、アクリルアミド、メタアクリル酸等を挙げる
ことができる。

本発明に従えば、以上のモノマー群のうち、少なくとも一般式(I)
20 または一般式(I-a)および一般式(I-b)のマクロマーとポリマーラテックス形成に関与するモノマーを含有し、そして場合によって一般式(II)のモノマーを共存させて重合せしめ、目的とするポリマーラテックス粒子を製造することができる。また、この重合の際に、磁性体

または標識を共存させてもよい。このような磁性体としては、フェライト、ネオジウム等の微粒子を挙げることができ、重合反応に悪影響を及ぼさない場合には、粒子を重合反応系で調製してもよい。標識としては、ポリマーラテックス粒子を、何らかの手段、例えば光学的、その他によ

5 つて識別するのに役立つ化合物または微粒子であって、限定されるものではないが、ユーロピウム（E u）およびテルビウム（T b）等のランタノイド系金属の粒子、半導体、例えばC d S、C d S e、Z n S、Z n S e、I n P等の発光性微粒子、さらにはシリカ、ゼオライト等を挙げることができる。ここで、微粒子とは平均粒径がナノメートル（n m）オー
10 ーダの粒子をいう。これらの粒子、特に、磁性体は表面を疎水化処理したものを使用するのが、ラテックス粒子中への混入率を高め、内包された磁性体のラテックス粒子中での安定性を高めることから好ましい。このような疎水化処理は、例えば、安息香酸ビニルまたはメタクリル酸3
15 ー（トリメトキシシリルプロピル）等の疎水性基と重合可能なエチレン性基を有する化合物のフェライト表面への吸着等の表面修飾を挙げることができる。

重合は、重合反応を経て形成されるラテックス粒子が均一の粒径を有し、そして相互に凝集しないような条件下であれば、如何なる条件下で行ってもよい。しかし、通常、ラジカル開始剤を用いて重合を行うことができるが、形成されるラテックス粒子が凝集する場合がある。ラジカル開始剤に代えて、レドックス開始剤を用いると、粒径が均一で、しかも凝集物を殆どもしくは全く含まないラテックス粒子が得られるので、レドックス開始剤を用いて重合を行うのが好ましい。このようなレドックス開始剤としては、過酸物とアミンの系、例えば、過酸化ベンゾイル

とN,N-ジメチルアニリンの系、過硫酸アンモニウムと亜硫酸ナトリウムの系、過硫酸アンモニウムと $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2$ の系、等を挙げることができる。

- 重合反応は、水性媒体中に上記のラテックス形成に関与するモノマー、
- 5 マクロマー、場合により、一般式 (II) のモノマー、磁性体または標識開始剤を存在せしめ、必要により、加熱 (約 100°C 迄) して行うが、レドックス重合では加熱を行うことなく、周囲温度下で、この反応系は、通常、アルゴン、窒素等の不活性雰囲気下に置かれる。水性媒体中の該ラテックス形成性モノマーは $0.1 \sim 50$ 重量/重量%となるように選ぶのが好都合である。上記の反応系を調製する順序は、重合反応を進行
- 10 することができる限り、いかなる順序であってもよく、限定されないが、好ましくは後述の実施例に従うのがよい。反応時間は、反応温度およびモノマーの種類により最適条件が変動するが、一般に 24 時間行うのがよい。ラジカル開始剤は、慣用されている開始剤が制限なく使用できる
- 15 が、代表的なものとしては、 $2,2'$ -アゾ・ビス・イソブチロニトリル (AIBN)、 $2,2'$ -アゾビス [2- (2-イミダゾリン-2-イル) プロパン]、 $2,2'$ -アゾビス (2-メチルブチロニトリル) 等のアゾ系化合物、過酸化ベンゾイル、 t -ブチルヒドロペルオキシド、ジイソプロピルペルオキシジカーボネート等の有機過酸化物を挙げることができる。このような開始剤は、総モノマー (マクロマーを含む) のモル数に
- 20 対し、 $0.001 \sim 10$ モル%、好ましくは $1 \sim 5$ モル%となるように用いることができる。また、上記のようなレドックス開始剤は、総モノマーのモル数に対して $0.00 \sim 10$ モル%、好ましくは $0.1 \sim 1$ モル%用いる。

こうして製造できるラテックスポリマー粒子は、遠心分離、沈降分離、透析、限外濾過、ゲル濾過、等を単独または組み合わせて使用して精製することができる。こうして得られるラテックスポリマー粒子のうち、例えば、反応性PEGマクロマーに由来する単位を有する粒子は、必要

5 により、保護基（例えば、アセタール）を脱離した後、それ自体既知の反応を用いて、上述のリガンド、例えば、抗体、抗原、ハプテン、レクチン、糖、ビオチン等を共有結合を介して粒子上に固定できる。

上記の重合において、各モノマーは、総モノマー重量当たり、マクロマー0.5～99.5重量%、ラテックス形成に関与するモノマー0.5～

10 99.5重量%（このうち、3～97重量%、好ましくは5～90重量%を用いて、予めラテックス粒子を形成していてもよい。）、一般式（Ⅱ）のモノマー0～95重量%（存在する場合は、0.5～95重量%）の割合で使用することができる。さらに必要により架橋剤を含めてもよい。

また、2種のマクロマーを使用する場合、一般式（Ⅰ-a）マクロマー

15 の量は、粒子分散性、非吸着特性などの点から、90重量%以下、好ましくは80～3重量%、より好ましくは60～5重量%であるのがよい。

一般式（Ⅰ-b）のマクロマーの量は、80重量%以下、好ましくは70～2重量%、より好ましくは50～5重量%であるのがよい。一般式（Ⅱ）のモノマーを含む場合、その量は、95重量%以下、好ましくは

20 90～10重量%、より好ましくは80～20重量%であるのがよい。

上記の重合系に際して、磁性体または標識を共存させることにより、これらの微粒子をポリマーラテックス粒子中に混入ないしは内包することができる。これらの微粒子は上記の総モノマー重量に対して、0.001～90重量%、好ましくは0.1～60重量%、特に好ましくは1～2

0重量%で共存せしめられる。

また、磁性体または標識の微粒子ポリマーラテックスを形成した後に、それらのラテックス粒子中に該微粒子を導入することもできる。例えば、該微粒子を含有し、ラテックス粒子を膨潤させることのできる液体（第1の液体という）に該ラテックス粒子を浸漬し、その後、ラテックス粒子を収縮させてラテックス粒子中に特性付与粒子を導入させることもできる。なお、ラテックス粒子の収縮の際、ラテックス粒子を収縮させる特性を有する液体（第2の液体という）にラテックス粒子を浸漬して、収縮を促進することもできる。例えば、ラテックス粒子が粒子保持部位としてアミノ基を有する場合（例えば、一般式（II）のZがジアルキルアミノエチルである場合）、第1の液体として酸性の液体、第2の液体としてアルカリ性の液体を挙げることができまる。すなわち、酸性の液体に該微粒子を含め、該酸性の液体にラテックス粒子を浸漬すると、ラテックス粒子は膨潤する。膨潤中に該微粒子が粒子内に侵入する。その後、ラテックス粒子をアルカリ性の液体に浸漬すると、ラテックス粒子は収縮し、ラテックス粒子内該微粒子が保持ないしは固定される。

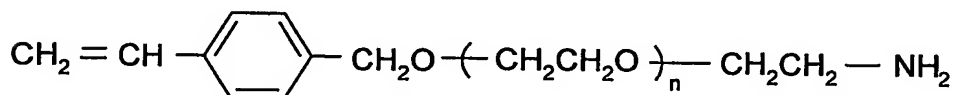
また、ラテックス形成に関与するモノマーとしてスチレンを用い、該スチレンのモノマー比が高いモノマー群を用いて得られたラテックス粒子の場合、第1の液体として水／アセトン混合溶媒を挙げることができる。水／アセトン混合溶媒に該微粒子を予め含ませておき、該混合液にラテックス粒子を浸漬する。浸漬中にラテックス粒子は膨潤し、該膨潤ラテックス粒子内に該微粒子が混入する。浸漬後、ラテックス粒子を乾燥し、水／アセトン混合溶媒を除去することにより、第1の粒子（特性付与粒子）をラテックス粒子内に保持ないしは固定することができる。

以上により、本発明に従うポリマーラテックス粒子または磁性体もしくは標識を含有するポリマーラテックス粒子、さらに所望ならば、水性媒体中で粒子表面上または親水性ポリマーセグメント鎖により該表面から離れた位置に存在することになるリガンド導入用基を介してリガンドが共有結合したポリマーラテックス粒子も提供できる。これらの粒子は、臨床診断用の診断剤として、または生体内に存在する特定の分子を単離、精製するためのアフィニティー担体等に使用できる。これらの分野での使用に際しては、マクロマーとして一般式（I-a）のマクロマーと一般式（I-b）のマクロマーを用いたラテックス粒子が、それらの表面への夾雑タンパク質等の非特異的吸着を殆どないし全く防止できるので好ましい。

以下、具体例に基づいて、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。

マクロマーの合成例 1 :

VB-PEG-NH₂ の合成



(化合物 1)

アルゴン下、反応容器に 0.25 mol/L のアセトン-K⁺テトラヒドロフラン (THF) 溶液 (8 mL、2 mmol) および 2 mol/L のビニルベンジルアルコール (VBA) THF 溶液 (1 mL、2 mmol) を加え 30 分間攪拌した後、エバポレータにより溶媒を除去した。残存物 (メタル化した VBA) を THF (10 mL) に溶解させた後、再度エバポレートすることでほぼ完全にアセトンの除去を行った。その

後、反応容器に溶媒としてTHF (40 mL) を加えメタル化したVBAを溶解した。

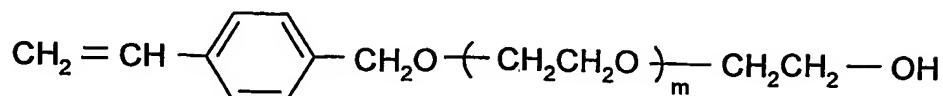
次にエチレンオキシド (EO; 11.2 mL、228 mmol、仕込み分子量5000) を加え水冷下で2日間攪拌し重合を行った。少量を
5 サンプリングした後、GPC測定を行いPEGの分子量を確認した。反応はEO重合後の反応溶液にトリエチルアミン (1.39 mL、10 mmol) を加えた溶液を、メタンスルホニルクロライド (「MSC」と略記する場合がある、0.465 mL、6 mmol) / THF (20 mL) 溶液に1時間30分かけて滴下することで停止させた。

10 精製はエーテル沈殿、ベンゼン凍結乾燥、減圧乾燥により行い、末端をメタンスルホニル (MS) 化したVB-PEG-MSを得た。

得られたVB-PEG-MSに28%アンモニア水溶液 (200 mL、およそ15000倍モル量) を加え室温で1日間攪拌した。その後、エバポレータによりアンモニアの除去、溶液の濃縮を行った。濃縮した溶
15 液を蒸留水に対して透析することで精製を行い (透析膜: MWCO1000 (Spectrum Laboratory 社製)、2日間、蒸留水を5回交換)、その後凍結乾燥することにより、VB-PEG-NH₂ (または化合物1) を得た。

ゲル浸透クロマトグラム (GPC) により、PEGの分子量が600
20 0程度 (繰返し単位 (CH₂CH₂O)_n のnが130~140に相当) であることを確認した。回収したポリマーの収量は11.3 gであった (仕込み総量11.967 g、VB-PEG-MSの¹H-NMRチャートの積分値からVBおよびMSの導入率を計算するとほぼ100%導入されていることがわかった。

マクロマーの合成例 2 : VB-PEG-OH の合成



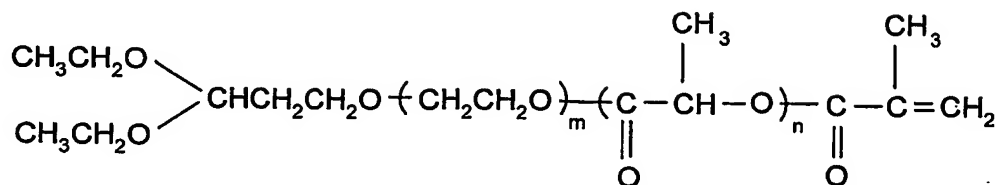
(化合物 2)

- 2 M VBA/THF 溶液 1 mL (2 mmol)、0.25 M アセトン
 5 ーカリウム THF 溶液 8 mL (2 mmol) をアルゴン下、室温で反応
 容器に加え、室温で 15 分間攪拌して VBA のカリウムアルコキシド溶
 液を得た。この反応混合物から減圧乾燥でアセトンを留去した。その後、
 THF 60 mL を加え、さらに冷却したシリンジでエチレンオキシド 6.
 8 mL (0.14 mol) を加えて室温で 2 日間攪拌して開環重合を行っ
 10 た。その後、メタノール 3 mL を加えて反応を止めた。この反応混合溶
 液を、-15℃に冷却したイソプロピルアルコールに注ぎ、マクロマー
 を沈殿させ、遠心分離操作 (6000 r.p.m., 40 分間、-10℃)
 を行い、マクロマー (化合物 2) を回収し、凍結乾燥して溶媒を除去し
 た。
- 15 得た化合物が目的物 (化合物 2 または VB-PEG-OH という) で
 あることは、上記に記載した測定条件にてゲルパーミエーションクロマ
 トグラフィー (GPC) (東ソー製 HLC-8020) 及び核磁気共鳴
 測定装置 (日本電子製 JEOL EX-400 (400 MHz)) によ
 り確認した。VB-PEG-OH の ¹H-NMR スペクトルを図 2 に示
 20 す。GPC の結果から、PEG 鎖の分子量は 2850、分子量分布 Mw
 /Mn = 1.04 である。

ビニル基の導入率は ¹H-NMR スペクトラムより算出し、ほぼ定量

的に導入されているのを確認した。

マクロマーの合成例 3 : アセタールー PEG / PLA - メタクリロイル
の合成



(化合物 3)

5

カリウム-ナフタレン / THF 溶液の調製法

ナフタレンの入ったアルゴン雰囲気下の容器に THF を加え溶解させ、
氷冷しながらナフタレンに対して 1.05 倍モル量の柱状カリウムを加
え、1 日間攪拌させた。この溶液を塩酸滴定して 0.3263 M カリウム
10 ナフタレン / THF 溶液を調製した。

アセタールー PEG / PLA - メタクリロイルの合成

THF 40 mL、3,3'-ジエトキシ-1-プロパノール 0.32 mL
(2 mmol) をアルゴン雰囲気下の容器に室温に加え、0.3263 M
カリウム-ナフタレン / THF 溶液 6.2 mL (2 mmol) を加え 15
15 分間攪拌してカリウムアルコキシド溶液を得た。この溶液に、冷却した
シリンジでエチレンオキシド 11.3 mL (0.23 mmol) を加えて室
温で 2 日間攪拌して開環重合を行い、アセタールー PEG-OH を合成
した。この重合溶液に 1 mol / L DL-ラクチド / THF 溶液 8.
4 mL (8.4 mmol) を加えて室温で 3 時間攪拌し、さらに重合反応
20 を行った。その後、無水メタクリル酸 4.5 mL (28 mmol) を加え、

室温で2日間攪拌して反応を止めた。このマクロマー混合溶液を-15℃に冷却したイソプロピルアルコールに注ぎ、マクロマーを沈殿させた。遠心分離操作(6000 r.p.m., 40分間、-10℃)を行い、マクロマーを回収した。さらにマクロマーをイソプロピルアルコールに注ぎ、マクロマーを沈殿させた。遠心分離操作(6000 r.p.m., 40分間、-10℃)によってマクロマーを精製する操作をした後、ベンゼンにマクロマーを溶解し凍結乾燥を行ってマクロマー(化合物3またはアセタール-PEG/PLA-メタクリロイルともいう)を回収した。

得た化合物が目的物であることは、上記に記載した測定条件にてゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC)(東ソー製 HLC-8020)及び核磁気共鳴測定装置(日本電子製 JEOL EX-400(400MHz))により確認した。GPCの結果から、PEG鎖の分子量は5530、分子量分布 $M_w/M_n = 1.03$ である。アセタール-PEG/PLA-メタクリロイルのラクチド鎖(PLA)の分子量はGPCの結果であるPEG鎖分子量及び $^1\text{H-NMR}$ スペクトラムより算出し、150である。ビニル基の導入率は $^1\text{H-NMR}$ スペクトラムより算出し、ほぼ定量的に導入されているのを確認した。

実施例1：磁性ラテックス粒子A-1の調製

5重量%ポリビニルアルコール(PVA)水溶液(40mL)を有する反応容器に上述で得たVB-PEG-NH₂(0.5g、繰返し単位(CH₂CH₂O):130~140個に相当)、ポリ(エチレングリコール)メチルエーテルメタクリレート50重量%水溶液(アルドリッチ、分子量:2,000、4.8mL、0.25g、繰返し単位(CH₂CH₂O):45~50個に相当)、フェリコロイド(FC、1mL)、

スチレン (St、3.3 mL、3 g)、過硫酸カリウム (KPS) (0.2 g) を加え、攪拌しながらアスピレータを用いて減圧脱気した。その後、減圧の系内をアルゴンで詰めることで常圧にした。i) 減圧脱気後、
ii) アルゴンで常圧にする、という i) 及び ii) の一連の作業を 3
5 回繰り返した。スリーワンモーターを用いて 500 rpm、60℃で 3
6 時間攪拌した後、磁性ラテックス粒子 A-1 を有する溶液を回収した。
回収した溶液を適量 (10~20 mL 程度) の蒸留水に 1 滴加え、軽く
溶液を振って分散させた後、強力な磁石を用いて磁性ラテックス粒子 A
-1 を沈降させた。上澄みを取り除き、沈降した磁性ラテックス粒子 A
10 -1 を再度蒸留水に分散させた。その後、上澄み及び沈殿を分散させた
溶液の動的光散乱 (DLS) 測定を行い、その結果、磁性ラテックス粒
子 A-1 の粒径は、0.67 μm であった。

実施例 2：磁性ラテックス粒子 A-2 の調製

5 重量% PVA 水溶液 (40 mL) を有する反応容器に上述で得た V
15 B-PEG-NH₂ (0.5 g)、ポリ (エチレングリコール) メチル
エーテルメタクリレート 50 重量% 水溶液 (アルドリッチ、分子量: 2,
000、4.8 mL、0.25 g) を加え、HCl を用いて pH 4 にし
た。その後、FC (1 mL)、St (3.3 mL、3 g)、KPS (0.
2 g) を加え、攪拌しながらアスピレータを用いて減圧脱気し、減圧
20 の系内をアルゴンで詰めることで常圧にした。i) 減圧脱気後、ii)
アルゴンで常圧にする、という i) 及び ii) の一連の作業を 3 回繰
り返した。スリーワンモーターを用いて 500 rpm、60℃で 48 時間
攪拌した後、磁性ラテックス粒子 A-2 を有する溶液を回収した。回収
した溶液を適量 (10~20 mL 程度) の蒸留水に 1 滴加え、軽く溶液

を振って分散させた後、強力な磁石を用いて磁性ラテックス粒子A-2を沈降させた。上澄みを取り除き、沈降した磁性ラテックス粒子A-2を再度蒸留水に分散させた。その後、上澄み及び沈殿を分散させた溶液のDLS測定を行い、その結果、磁性ラテックス粒子A-2の粒径は、

5 0.51 μm であった。

<PEG化磁性ナノ粒子の非特異吸着特性の確認>

遠心分離と磁石とを用いた分離により精製した磁性ラテックス粒子A-2（濃度：2.5 mg/mL）及びカルボン酸表面基を有する市販フェライトビーズB-1（濃度：2.5 mg/mL）を調製し、この両サンプル溶液を3 mLずつ取り、永久磁石上に配置したネジロ試験管中で静置した。ここで磁石に引かれて沈殿したものと上澄みを分離して、上澄みを捨て新たにPBSを3 mL加えてVortex（10 s、speed 8）洗浄、上澄み除去という操作を3回繰り返した。これに45 mg/mLのBSA（ウシ血清アルブミン：人体中とほぼ同濃度）3 mL

10 を加え、室温1時間静置した。1時間後に磁石で粒子を固定し上澄みのBSA-PBSを除去しこれにPBS 3 mLを加えてVortex（10 s、speed 8）で粒子をリンスし、上澄みを除去する操作を3回繰り返した後、SDS-PBS 2.5 mLに1時間浸漬させて粒子表面に付着したBSAを剥がしとった。1時間後Vortex（10 s、speed 8）で粒子をリンスし、この上澄み液2 mLにBSA溶液2 mL

15 を加え60℃で1時間インキュベートした。1時間後UV-vis分光計で波長562 nmにおける吸光度を測定した。予め作成した検量線より吸着BSA濃度を算出した。

20

算出された結果、磁性ラテックス粒子のBSA吸着量は約0.0015 mg/mlであり、フェライトビーズのそれ(0.02 mg/ml)の約13分の1であった。また初期BSA濃度(45 mg/ml)の約27800分の1の量であることがわかった。この非特異吸着の減少の
5 主因は粒子の周りを覆うPEGの高い運動性によって、タンパク質を排除しているものと考えられる。そのため裸のFe粒子(フェライト粒子)との差が大きく現れたものと考えられる。

実施例3：ビオチン化磁性ラテックス粒子及びビオチン化フェライトビーズの調製

10 <フェライトビーズB-1のビオチン化>

2.5 mg/ml フェライトビーズ超純水溶液12 mlを遠心分離(3600 rpm/30分/5℃)して、上澄みを除去して新たに超純水12 mlを加えて再分散させた。このうち6 mlを分取した。これにEDC (N-エチル-N'-(ジメチルアミノプロピルカルボジイミド)) 3 ml
15 及びNHS (N-ヒドロキシスクシミド) 3 mlの混合溶液を加え10分間静置した。10分後、該混合溶液を遠心分離(3600 rpm/20分/5℃)して上澄みを除去し、新たに超純水6 mlを加えて再分散させた。これに1 mg/mlのビオシチンヒドラジド水溶液1 mlを加えて30分間静置した。30分後、得られた溶液を遠心分離(3600 r
20 p m/10分/5℃)して上澄みを除去し、新たに同量の超純水を加え再分散をさせた。これに2-アミノエタノール3 mlを加えて20分間静置した。これを遠心分離(3600 rpm/5分/5℃)して上澄みを除去し、新たに超純水を加えるという操作を3回繰り返し、ビオチン化フェライトビーズB-2を得た。

＜磁性ラテックス粒子A-1のビオチン化＞

2. 5 mg / ml 磁性ラテックスA-2水溶液 4 ml を遠心分離 (10,000 rpm / 30分 / 5℃) して上澄みを除去後、同量の超純水を加え 0.1 mg / ml の活性エステルビオチンを 2 ml 加えて 20 分間
5 静置した。その後 0.15 mol / dm³ NaCl 水溶液で洗浄し、ビオチン化磁性ラテックス粒子A-3を得た。

ビオチン化磁性ラテックス粒子A-3、磁性ラテックス粒子A-1、
ビオチン化フェライトビーズB-2、及びフェライトビーズB-1の4
種類の粒子水溶液を各 100 μL (粒子濃度 2.5 mg / mL) とり、
10 テキサスレッドストレプトアビジン (texasredstreptavidin) 0.01
mg / mL (6.7×10^{-7} モル / L)、FITC-BSA 0.045
mg / mL (6.7×10^{-7} モル / L) を各 500 μL ずつ加えた。この
まま 1 時間静置して、1 時間後に磁石で粒子を固定して慎重に試験管内
の溶液を 1 mL とり、PBS 水溶液を 1 mL 加えて希釈し、Volte
15 x で再分散させることで洗浄した。1 回洗浄する毎にテキサスレッドと
FITC の蛍光画像を CCD カメラで取り込み画像解析した。

得られた画像から、FITC-BSA 吸着量 (図 1) 及びストレプト
アビジン吸着量 (図 2) の洗浄回数による変化を各々の粒子についてグ
ラフ化した。なお、ビオチンは、アビジンと特異的な吸着又は結合を示
20 す物質である一方、BSA とは不所望な吸着又は結合 (非特異的な吸着
又は結合) を示す物質である。

図 1 から、ビオチン化磁性ラテックス粒子A-3 及び磁性ラテックス
粒子A-1 は、洗浄を 2 回又は 3 回行うことにより、BSA の吸着がほ
ぼゼロとなっていることがわかる。一方、ビオチン化フェライトビーズ

B-2及びフェライトビーズB-1は、洗浄を10回行ってもBSAの吸着が観察される。このことから、ビオチン化磁性ラテックス粒子A-3及び磁性ラテックス粒子A-1は、非特異的な吸着が抑制されている一方、ビオチン化フェライトビーズB-2及びフェライトビーズB-1、
5 特にビオチン化フェライトビーズB-2は、非特異的な吸着が観察されることがわかる。

図2のビオチン化磁性ラテックス粒子A-3と磁性ラテックス粒子A-1との結果を比較することにより、ビオチン化磁性ラテックス粒子A-3は、複数回洗浄しても特異的な吸着又は結合により、ストレプトアビジンが吸着している一方、磁性ラテックス粒子A-1は、ビオチンを有していないため、2回洗浄を行うことにより、ストレプトアビジンの吸着量がほぼゼロとなっていることがわかる。したがって、図2から、
10 ビオチンによる特異的吸着又は結合が観察された。

以上、図1及び図2から、ビオチン化磁性ラテックス粒子A-3は、
15 ビオチンを有することにより特異的吸着が発現し、且つ短鎖のPEGによって非特異的吸着を抑制できることが観察された。

実施例4：安息香酸表面処理フェライト粒子およびアセタールーPEG
／PLA-メタクリロイルの共存下でのスチレンの分散重合

(1) 安息香酸ビニル修飾フェライト粒子の調製

20 水150mLに塩酸を加えてpHを1.7に調節した。この溶液にFeCl₃ 0.405g (1.5×10^{-3} M) およびFeSO₄ 0.250g (9.0×10^{-4} M)を加えて攪拌し、溶解した。この溶液にアンモニア溶液を加えpHが9になるまで激しく攪拌した。その後、溶液に安息香酸ビニル1.776g (0.024M)を加えて静置した後、凍結乾燥し

て、標題の表面処理フェライトを得た。

(2) (1) で得られた安息香酸ビニル修飾フェリコロイド 0.045 g をスチレン 4 mL に分散させ、次いで水 45 mL、マクロマーの合成例 3 に従って製造したアセタール-PEG/PLA-メタクリロイル 0.1 g および過酸化ベンゾイル 0.085 g を加えた。攪拌、脱気後、N,N-ジメチルアニリン 0.1 g を加え、400 rpm で攪拌し、重合反応を 20 時間続けた。こうして得られるラテックス粒子は半径粒径 200 nm であった。

同一条件下で N,N-ジメチルアニリンの代わりに加熱 (60°C) 重合させると全く分散しない巨大会合体が生成し、均一磁性粒子を作製することができなかった。

それぞれ得られたラテックス粒子の様子を示す図に代わる写真を図 3 として提出する。ここで、(a) がレドックス開始剤を用いた場合のラテックスであり、(b) が加熱下にラジカル開始剤を用いた場合のラテックスである。

ソープフリー重合によるポリスチレンラテックスの調製例

スチレン 4 mL、蒸留水 45 mL、過硫酸カリウム 0.024 g を 100 mL フラスコに加え、アルゴンバブリングを 10 分間行った後、350 rpm で攪拌しながら 70°C、5 時間反応させた。その後 SEM によって粒径を攪拌したところ、平均粒径 1 μ m の単分散スチレンラテックスが調製された。

実施例 5 : シード重合

上記のポリスチレンラテックスの調製例で調製したスチレンラテックス分散液 (0.078 g/mL ; 粒径 = 1 μ m) の 31 mL、蒸留水 45 mL

L、スチレン 2.6 mL、ビニル安息香酸修飾フェリコロイド 0.13 g
(実施例 4 で調製したもの)、アゾビスイソブチロニトリル (AIBN)
0.048 g、アセタール-PEG/PLA-メタクリロイル (マクロマ
5 ーの合成例 3 で調製したもの) を 200 mL 丸底フラスコに加え、10
分間撹拌した後、市販の HO-PEG-OH (MW=6,000) 4 g の
水溶液 10 mL を加え、脱気した後 12 時間撹拌した。この分散液を 7
0℃で 24 時間、270 rpm で撹拌しながら反応させた。得られた分
散ラテックスは高い分散安定性を示すとともに、磁石によくくっつく磁
性ラテックス粒子が得られた。得られた磁性ラテックス粒子の分散状態
10 を表す図に代わる顕微鏡写真を図 4 に示す。

産業上の利用可能性

本発明によれば、水性媒体中に均一かつ安定に分散するポリマーラテ
ックス粒子が提供できるこのラテックス粒子は磁性体等を安定に内包で
き、また、粒子表面への夾雑タンパク質等の非特異的吸着を著しく抑制
15 できたものである。したがって、限定されるものでないが、本発明は臨
床診断剤を提供し、さらにはそれらを利用する産業で利用できる。

請求の範囲

1. (i) 片末端に重合可能なエチレン性基を有し、疎水性ポリマーセグメントを介するかもしくは介することなく、他の片末端側に親水性ポリマーセグメント（ここで、このセグメントはリガンド導入用基で末端化（terminated）されていてもよい。）を有するマクロマー、
- 5 (ii) 1種もしくは2種以上のラテックス形成に関与するモノマー、
- (iii) 重合開始剤、および
- (iv) 場合によって、存在してもよい磁性体または標識
- を含んでなる水性媒体中で、該水性媒体を攪拌しながら重合反応を行う
- 10 ことを特徴とするラテックスポリマー粒子の製造方法。
2. 重合開始剤がラテックス開始剤である請求項1の方法。
3. 磁性体または標識が存在する請求項2の方法。
4. 親水性ポリマーセグメントがポリ（エチレングリコール）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリ（ビニルピロリドン）、ポリ（デキストラン）、ポリ（デキストリン）およびゼラチンからなる群より選ばれる水溶性ポリ
- 15 マー由来のセグメントであり、そして疎水性セグメントがポリ（ラクチド）、ポリ（ ϵ -カプロラクトン）、ポリ（ α -および／もしくは β -ベンジルアスパラギン酸）および（ γ -ベンジルグルタミン酸）からなる群より選ばれる水難溶性ポリマー由来である請求項2の方法。
- 20 5. マクロマーが、疎水性ポリマーセグメントを有さず、そして親水性ポリマーセグメントがポリ（エチレングリコール）由来である請求項2の方法。
6. マクロマーが、疎水性セグメントを有さず、そして他の片末端側のポリ（エチレングリコール）セグメントがヒドロキシル基、カルボキ

- シル基、スルホ基、アルデヒド基、アミノ基、イミノ基、メルカプト基、活性エステル型の保護されたヒドロキシシル基、活性エステル型の保護されたカルボキシシル基、アセタール型の保護されたアルデヒド基、有機スルホニルで保護されたヒドロキシシル基、反応性の保護されたアミノ基および $C_1 - C_4$ アルコキシシル基からなる群より選ばれる基で末端化されている、請求項 2 の方法。

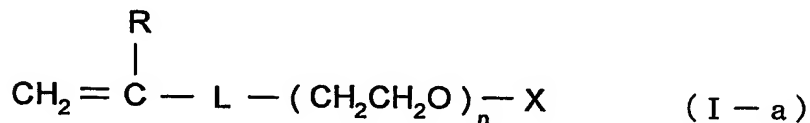
7. 重合反応が、予め (ii) に記載のラテックス形成に関与するモノマーを用いて形成したラテックス粒子の共存下で行われる請求項 1 の方法。

- 10 8. ラテックス形成に関与するモノマーが、スチレン、 α -メチルスチレン、p-プロモスチレン、ビニルトルエン、1-ビニルナフタレン、(メタ)アクリル酸 $C_1 \sim C_4$ アルキルおよびジビニルベンゼンからなる群より選ばれる請求項 7 の方法。

9. 磁性体が存在する請求項 7 の方法。

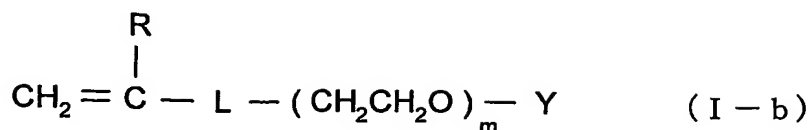
- 15 10. 磁性体が疎水化処理されたものである請求項 7 の方法。

11. マクロマーが、2種類存在し、第一のマクロマーが一般式 (I-a) :



で表され、そして

- 20 第二のマクロマーが一般式 (I-b) :



で表され、

上記各式中、Rは独立して、水素原子または炭素原子数1～3のアルキル基を表し、

5 Lは独立して、 $(\text{CH}_2)_a\text{O}$ 、 COO 、 OCO 、 CONH 、 $(\text{CH}_2)_a\text{NH}$ 、フェニレン(C_6H_4)、フェニレンオキシ($\text{C}_6\text{H}_4\text{O}$)、オキシフェニレン(OC_6H_4)、ベンジルオキシ($\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{O}$)またはオキシベンジル($\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_4$)を表し(ここでaは1～3の整数であり、各基は記載された方向で上記の各式中に組み込まれる。)、

nは11～10,000の整数を表し、

mは各nに関連してn数より10以上小さい整数を表し、

15 X(またはポリ(エチレングリコール)セグメントが末端化された基)は、 $(\text{CH}_2)_b$ もしくは $\text{CO}(\text{CH}_2)_b$ を介するかまたは介することなく結合したヒドロキシル基、カルボキシル基、スルホ基、アルデヒド基、アミノ基、イミノ基、活性エステル型の保護されたヒドロキシル基、活性エステル型の保護されたカルボキシル基およびアセタール型の保護されたアルデヒド基からなる群より選ばれる基を表し、そして

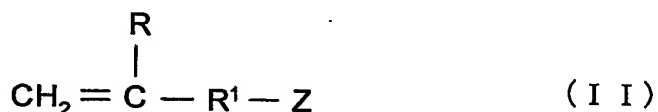
20 Yは水素原子、ハロゲン原子で置換されていてもよい炭素原子数1～6のアルキル基またはハロゲンもしくは炭素原子数1～3のアルキル基もしくはアルコキシ基でベンゼン環が置換されていてもよ

いベンジル基を表す、)

の請求項 1 または 2 の方法。

- 1 2. 1 種もしくは 2 種以上のラテックス形成に関与するモノマーが
 スチレン、 α -メチルスチレン、p-ブロモスチレン、ビニルトルエン、
 5 1-ビニルナフタリン、(メタ) アクリル酸 C_1-C_4 アルキルおよびジ
 ビニルベンゼンからなる群より選ばれる請求項 1 1 の方法。

1 3. さらなるモノマーとして、一般式 (II) :



10 (上式中、R は水素原子または炭素原子数 1 ~ 3 のアルキル基を表
 し、

15 R^1 は単結合、 $(\text{CH}_2)_a$ 、 $\text{CH}=\text{CH}$ 、 COO 、 OCO 、 CONH 、 $(\text{CH}_2)_a\text{NH}$ 、フェニレン (C_6H_4)、フェニレンオキシド ($\text{C}_6\text{H}_4\text{O}$)、オキシフェニレン (OC_6H_4)、ベンジルオキシ ($\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{O}$) またはオキシベンジル ($\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_4$) を表し (こ
 こで a は 1 ~ 3 の整数であり、各基は記載された方向で該式中に組み
 込まれる。)、

Z は水素原子、アミノ基、カルボキシル基、シアノ基、アミド基、
 ウレタン基およびウレア基からなる群より選ばれる基を表す。)

が共存する請求項 1 または 2 の方法。

20 1 4. 磁性体が存在する請求項 2 の方法。

1 5. 磁性体が疎水化処理されたものである請求項 1 4 の方法。

1 6. 磁性体または標識が存在しない請求項 1 の方法。

1 7. 請求項 1 6 に記載の方法によりラテックスポリマー粒子を製造

し、次いで該ラテックス粒子を膨潤させうる液体であって、磁性粒子または標識を懸濁させた液体中に前記ラテックスポリマー粒子を浸漬し、その後、前記ラテックスポリマー粒子を収縮させて、該ラテックスポリマー粒子中に磁性粒子または標識を混入させることを特徴とするラテックス

5 クスポリマー粒子の製造方法。

18. 使用される総モノマー重量当たり、

10 a) 片末端に重合可能なエチレン性基を有し、疎水性ポリマーセグメントを介するかもしくは介することなく、他の片末端側に親水性ポリマーセグメント（ここで、このセグメントはリガンド導入用基で末端化
15 (terminated) されていてもよい。) を有するマクロマー 0.5 ~ 99.5 重量%、および

15 b) 1 種もしくは 2 種以上のラテックス形成に関与するモノマー 0.5 ~ 99.5 重量%の重合によって得られる高分子材料であって、動的光散乱 (DLS) 光度計で測定した場合に平均粒径 $0.01 \mu\text{m} \sim 5 \mu\text{m}$ を有し、粒子の表層 (シエル) 領域に親水性ポリマーセグメントが存在する、ことを特徴とするポリマーラテックス粒子。

19. 磁性体または標識が粒子の核 (コア) 領域に混入している請求項 18 のラテックス粒子。

20 20. b) のラテックス形成に関与するモノマーが、その重量当たり、3 ~ 97 重量%のモノマーは予めラテックス粒子の形成に用いられている請求項 18 または 19 のラテックス粒子。

21. ラテックス形成に関与するモノマーから本質的になるラテックス粒子に磁性体が付着もしくは混入されており、かつ該ラテックス粒子表面に、少なくとも a) のマクロマーおよび b) のラテックス形成に関

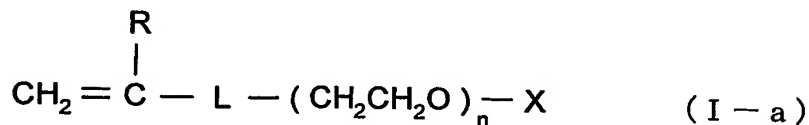
与するモノマーに由来するポリマーセグメントが存在する請求項 18 のラテックス粒子。

22. マクロマーの親水性ポリマーセグメントがポリ（エチレングリコール）セグメントである請求項 21 のラテックス粒子。

- 5 23. マクロマーが疎水性ポリマーセグメントを有さず、そして親水性ポリマーセグメントがポリ（エチレングリコール）に由来するセグメントである請求項 18 のラテックス粒子。

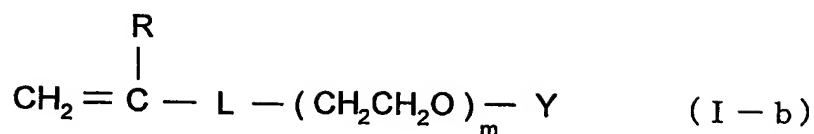
24. マクロマーが、疎水性セグメントを有さず、そして他の片末端側のポリ（エチレングリコール）セグメントがヒドロキシル基、カルボキシル基、スルホ基、アルデヒド基、アミノ基、イミノ基、メルカプト基、活性エステル型の保護されたヒドロキシル基、活性エステル型の保護されたカルボキシル基、アセタール型の保護されたアルデヒド基、有機スルホニルで保護されたヒドロキシル基、反応性の保護されたアミノ基および $C_1 \sim C_4$ アルコキシル基からなる群より選ばれる基で末端化
- 10
- 15 されている請求項 23 のラテックス粒子。

25. マクロマーが、2 種類存在し、第一のマクロマーが、一般式（I-a）：



で表され、そして

- 20 第二のマクロマーが一般式（I-b）：



で表され、

上記各式中、Rは独立して、水素原子または炭素原子数1～3のアルキル基を表し、

5 Lは独立して、 $(\text{CH}_2)_a\text{O}$ 、 COO 、 OCO 、 CONH 、 $(\text{CH}_2)_a\text{NH}$ 、フェニレン (C_6H_4)、フェニレンオキシ ($\text{C}_6\text{H}_4\text{O}$)、オキシフェニレン (OC_6H_4)、ベンジルオキシ ($\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{O}$) またはオキシベンジル ($\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_4$) を表し (ここでaは1～3の整数であり、各基は記載された方向で上記の各式中に組み込まれる。)、

10 nは1～10,000の整数を表し、

mは各nに関連してn数より10以上小さい整数を表し、

15 X (またはポリ (エチレングリコール) セグメントが末端化された基) は、 $(\text{CH}_2)_b$ もしくは $\text{CO}(\text{CH}_2)_b$ を介するまたは介することなく結合したヒドロキシル基、カルボキシル基、スルホ基、アルデヒド基、アミノ基、イミノ基、活性エステル型の保護されたヒドロキシル基、活性エステル型の保護されたカルボキシル基およびアセタール型の保護されたアルデヒド基からなる群より選ばれる基を表し、そして

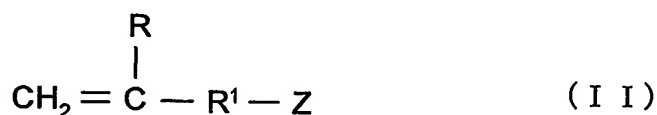
20 Yは水素原子、ハロゲン原子で置換されていてもよい炭素原子数1～6のアルキル基またはハロゲンもしくは炭素原子数1～3のアルキル基もしくはアルコキシ基でベンゼン環が置換されていてもよ

いベンジル基を表す、)

の請求項 24 のラテックス粒子。

26. 1 種もしくは 2 種以上のラテックス形成に関与するモノマーが
スチレン、 α -メチルスチレン、p-ブロモスチレン、ビニルトルエン、
5 1-ビニルナフタリン、(メタ) アクリル酸 C_1-C_4 アルキルおよびジ
ビニルベンゼンからなる群より選ばれる請求項 25 のラテックス粒子。

27. 高分子材料が誘導されるモノマーとして、一般式 (II) :



10 (上式中、R は水素原子または炭素原子数 1 ~ 3 のアルキル基を表
し、

R' は単結合、 $(\text{CH}_2)_a$ 、 $\text{CH}=\text{CH}$ 、 COO 、 OCO 、 CON
H、 $(\text{CH}_2)_a\text{NH}$ 、フェニレン (C_6H_4)、フェニレンオキシド ($\text{C}_6\text{H}_4\text{O}$)、
15 オキシフェニレン (OC_6H_4)、ベンジルオキシ ($\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{O}$) またはオキシベンジル ($\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_4$) を表し (ここ
で、a は 1 ~ 3 の整数であり、各基は記載された方向で該式中に組
み込まれる。)、

Z は水素原子、アミノ基、カルボキシル基、シアノ基、アミド基、
ウレタン基およびウレア基からなる群より選ばれる基を表す、)

が共存する請求項 23 のラテックス粒子。

20 28. ポリ (エチレングリコール) セグメントが末端化された基を介
してリガンドが共有結合されている請求項 24 または 25 のラテックス
粒子。

29. 磁性粒子が混入しており、該磁性粒子が疎水化处理されたものである請求項25または28のラテックス粒子。

Fig. 1

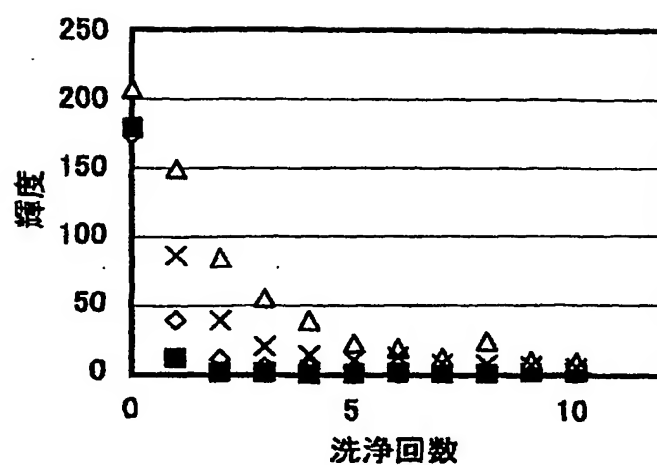


Fig. 2

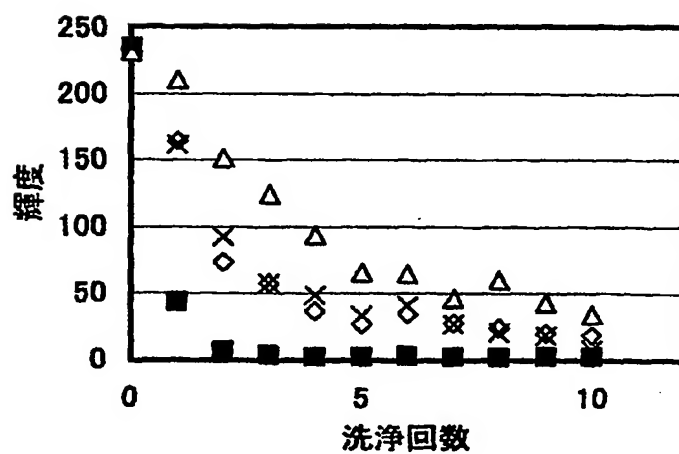
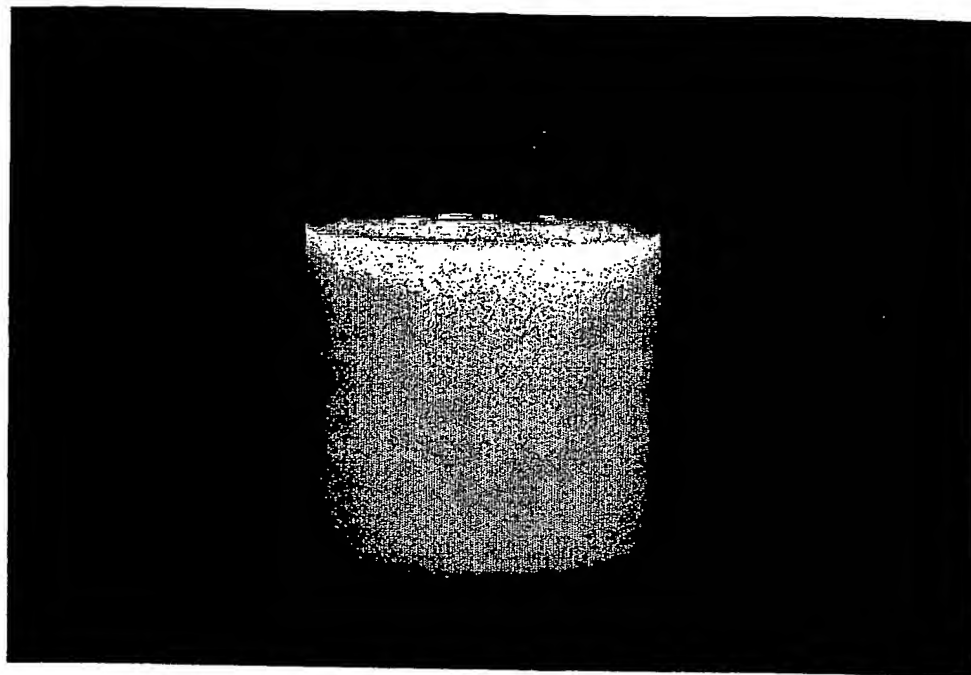


Fig. 3

BEST AVAILABLE COPY

(a)



(b)

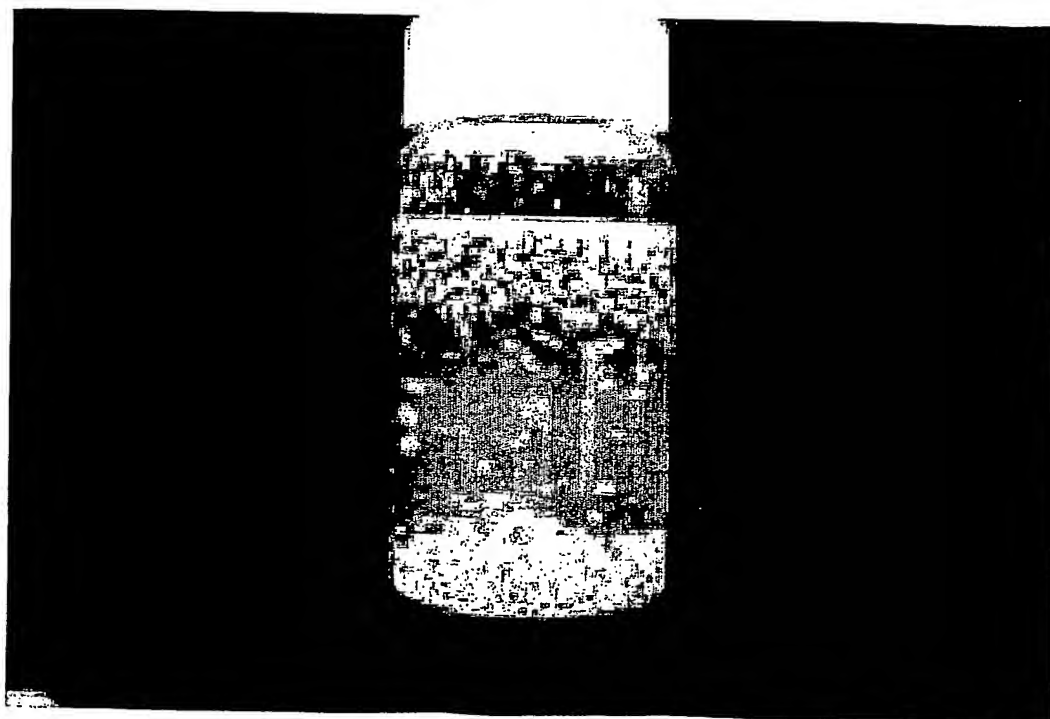
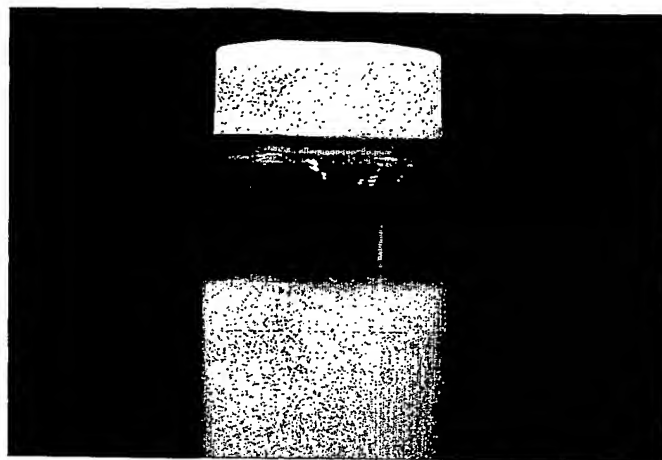


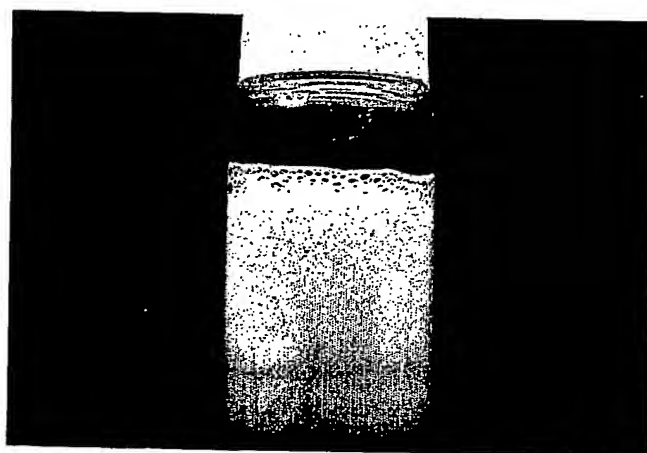
Fig. 4

BEST AVAILABLE COPY

(a)



(b)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16326

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C08F290/02, C08F2/44, G01N33/545, A61K47/30, H01F1/28, H01F1/36

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C08F290/00-290/14, C08F299/00-299/08, C08F2/44, G01N33/545, A61K47/30, H01F1/12-1/375

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	<p>WO 97/45468 A1 (EASTMAN CHEMICAL CO.), 04 December, 1997 (04.12.97), Claims and examples</p> <p>& WO 97/45495 A1 & WO 01/90272 A2 & EP 902813 A & EP 1290101 A & US 5998543 A1 & US 6417267 B1 & JP 14-502443 A & DE 69700813 T & AU 3212297 A & AU 3285997 A & AU 729319 B & CA 2255828 A & ES 2141620 T & BR 9709378 A</p> <p>& WO 97/45490 A1 & EP 902800 A & EP 902814 A & US 5891950 A1 & US 6297328 B1 & JP 12-516271 A & JP 14-502442 A & DE 69715404 T & AU 3212397 A & AU 710775 B & CA 2255702 A & CA 2257107 C & ES 2179349 T & BR 9709389 A</p>	<p>1, 2, 16, 18 3-15, 17, 19-29</p>

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
02 April, 2004 (02.04.04)

Date of mailing of the international search report
20 April, 2004 (20.04.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16326

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	& BR 9709396 A & BR 0111096 A & CN 1226260 A & CN 1226275 A & CN 1226276 A	

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷: C08F290/02, C08F2/44, G01N33/545,
A61K47/30, H01F1/28, H01F1/36

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷: C08F290/00-290/14, C08F299/00-299/08,
C08F2/44, G01N33/545, A61K47/30, H01F1/12-1/375

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	WO 97/45468 A1 (EASTMAN CHEMICAL COMPANY), 1997. 12. 04, Claims and Examples &WO 97/45495 A1 &WO 97/45490 A1 &WO 01/90272 A2 &EP 902800 A &EP 902813 A &EP 902814 A &EP 1290101 A &US 5891950 A1 &US 5998543 A1 &US 6297328 B1 &US 6417267 B1 &JP 12-516271 A &JP 14-502443 A &JP 14-502442 A	1, 2, 16, 18 3-15, 17, 19-29

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02. 04. 2004

国際調査報告の発送日

20. 4. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小野寺 務

4J

8118

電話番号 03-3581-1101 内線 3455

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	&DE 69700813 T &DE 69715404 T &AU 3212297 A &AU 3212397 A &AU 3285997 A &AU 710775 B &AU 729319 B &CA 2255702 A &CA 2255828 A &CA 2257107 C &ES 2141620 T &ES 2179349 T &BR 9709378 A &BR 9709389 A &BR 9709396 A &BR 0111096 A &CN 1226260 A &CN 1226275 A &CN 1226276 A	